

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Filip Car

EKSPERIMENTALNI DIZAJN I OPTIMIZACIJA ANALITIČKOG
POSTUPKA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada:

prof.dr.sc. Tomislav Bolanča

Članovi ispitne komisije:

prof.dr.sc. Tomislav Bolanča

doc.dr.sc. Šime Ukić

dr.sc. Ivana Šagud

Zagreb, rujan 2016.

Zahvaljujem se obitelji, kolegama i prijateljima na svoj potpori, a posebno se zahvaljujem mentoru prof.dr.sc. Tomislavu Bolanči na savjetima i konstruktivnim kritikama koje su mi pomogle pri izradi ovog završnog rada.

Sažetak

U ovome radu su opisane mogućnosti primjene metoda eksperimentalnog dizajna i optimizacije u analitičkim postupcima. Eksperimentalni dizajn i optimizacija u praksi se koriste kako bi se osigurala bolja učinkovitost i razne uštede pri provedbi istraživanja. Ključan korak predstavlja odabir faktora koji značajno utječu na proces, a njihov broj ovisi o kompleksnosti sustava. Upravo kod kompleksnih analiza, kao što su razne analize sastavnica okoliša, eksperimentalni dizajn se pokazao kao izuzetno koristan alat jer kvalitetnim planiranjem samog uzorkovanja i daljnjih metoda obrade uzorka te mjerenja možemo osigurati znatno pouzdaniju analizu samog uzorka.

U radu se želi naglasiti važnost postupka uzorkovanja koji predstavlja najkritičniji dio analitičkog sustava. Loše uzorkovanja tj. nereprezentativan uzorak unosi najveću pogrešku u analitički proces jer je pogreška uzorkovanja višestruko veća od mjerne pogreške, pa i ukupna pogreška ponajprije ovisi o načinu i planu uzorkovanja. Istraživanja su pokazala da je postupak uzorkovanja u nekim slučajevima odgovoran za više od 80% ukupnog standardnog odstupanja analitičkoga procesa.

Definirana je i optimizacija kao postupak definiranja najpovoljnijih rješenja za dane početne uvjete iz skupa mogućih rješenja. Brojne metode optimizacije koriste se u gotovo svakom analitičkom procesu za dobivanje pouzdanijih podataka, uz manje utrošenog vremena, resursa i finansijskih sredstava.

Dan je primjer upotrebe eksperimentalnog dizajna i optimizacije iz prakse. Radi se o upotrebi empirijskog modeliranja interferencijskih utjecaja na određivanje kalija i natrija u vodi metodom plamene fotometrije. Iz navedenog primjera može se zaključiti da je upotrebom empirijskog modeliranja znatno poboljšana preciznost mjerenja što samo dodatno potvrđuje korisnost i učinkovitost metoda eksperimentalnog dizajna i optimizacije.

Ključne riječi: eksperimentalni dizajn, dizajn faktora, uzorkovanje, optimizacija, plamena fotometrija

Abstract

This work describes possible applications of experimental design and optimization methods in analytical procedures. Experimental design and optimization in practice are being used as assurance to better efficiency and versatile economic solutions during the research. Crucial step is the selection of factors which considerably affect the process and their number depends on the complexity of the system. Exactly at a complex analysis, like environmental ones, experimental design has shown itself as exceptionally useful tool because the quality plan of sampling and measuring assures considerably more reliable analysis of the same sample.

The importance of the sampling procedure is emphasized as the most critical part of analytical system. A non-representative sample is the greatest mistake, even multiple times greater than the one in measuring, so the total mistake depends on the methods and planning of the sampling procedure. Researches have shown in some cases the procedure of sampling is responsible for more than 80% of total standard deviation of analytical process.

Optimization is defined as the procedure of choosing the most efficient solutions for given conditions out of all possible ones. Number of optimization methods are being used in almost every analytical process for getting a trustworthy data with less spent time and financial resources.

There is an example of using the experimental design and optimization in practice. It is about using an empirical modeling of the effects of interference on the flame photometric determination of potassium and sodium in water. That example leads to a conclusion that using the empirical modeling considerably makes measuring more precise which additionally confirms the usefulness and effectiveness of experimental design and optimization methods.

Keywords: experimental design, factorial design, sampling, optimization, flame photometry

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Opći dio	2
2.1. Eksperimentalni dizajn	2
2.2. Temeljna načela.....	3
2.2.1. Ceteris – paribus princip	4
2.3. Dizajn faktora	4
2.3.1. Podjela faktorskih dizajna.....	6
2.3.2. Faktorski dizajni viših redova.....	7
2.3.3. Određivanje razina faktora.....	8
2.3.4. Poopćivanje dizajna	8
2.4. Analiza varijancije (ANOVA).....	9
2.4.1. Primjer analize varijancije pomoću F-testa.....	9
2.5. Uzorkovanje.....	11
2.5.1. Postupak uzorkovanja	11
2.5.2. Osiguravanje reprezentativnosti uzorka.....	12
2.5.3. Pogreške uzorkovanja	13
2.5.4. Dizajn plana uzorkovanja	14
2.5.5. Uzorkovanje vode	15
2.6. Optimizacija.....	17
2.6.1. Simpleks metoda	19
2.6.2. Nelder – Mead metoda rješavanja simpleksa.....	20
3. Pregledni dio	23
3.1. Empirijsko modeliranje interferencijskih utjecaja na određivanje	23
3.2. Plamena fotometrija.....	23
3.3. Problem.....	23
3.4. Korišteni dizajn i modeli	24
3.5. Izvedba eksperimenta	25
4. Rezultati i rasprava	26
4.1. Izračun i testiranje regresijskih koeficijenata	27
4.2. Ispitivanje regresijskih koeficijenata	27

4.3. Izračun analitičke greške uzrokovane interferencijskim utjecajima.....	28
5. Zaključak	30
6. Popis simbola	31
7. Literatura	32
8. Životopis	34

1. Uvod

Nezaobilazna je uloga kemijske analize u očuvanju, nadziranju i zaštiti okoliša. Da bi se obavilo zahtjevno prikupljanje vrlo složenih uzoraka iz okoliša, izabrao pravi postupak njihove pripreme za analizu, te da bi se mogla donijeti odluka o tehnici odjeljivanja ispitivanoga analita iz matice uzorka i provesti najprikladnija metoda analize, potrebno je široko analitičko znanje. U rješavanju problematike kemije i analitike okoliša u praksi često primjenjujemo razne kemometrijske metode, a sama kemometrija definirana je kao dio kemije koji proučava primjenu matematičkih, statističkih i ostalih metoda zasnovanih na formalnoj logici.

Kemometrija se rabi u svrhu planiranja i optimizacije procesa dobivanja korisne informacije, počevši od eksperimentalnog dizajna i uzorkovanja, optimizacije analitičke metodologije, razvoja i uporabe metoda za detekciju i obradbu signala, te obradbu podataka analize. Pomoću tih metoda podaci iz velikih skupova mogu se sažimati, te otklanjati nepravilnosti i šumovi, vizualizirati složeni, u pravilu višedimenzijski kvalitativni podaci, detektirati i identificirati uzroci onečišćenja, te kvalificirati i kvantificirati onečišćivala, odrediti prostorne i vremenske raspodjele onečišćivala, ispitati interakcije između onečišćivala i okoliša kao i procijeniti i ocijeniti razine onečišćenosti okoliša u sustavu očuvanja kvalitete.¹

2. Opći dio

2.1. Eksperimentalni dizajn

Eksperimentalni dizajn se odnosi na postupke planiranja istraživanja i samih eksperimenata koji će biti uključeni u istraživanje. Ti postupci temelje se na statističkom ocjenjivanju rezultata eksperimenata kako bi se, sa određenom razinom sigurnosti, mogli donositi zaključci o bitnim karakteristikama tj. značajkama procesa. Poznajemo razne metode eksperimentalnog dizajna i najčešće ih primjenjujemo u istraživanju značajnih faktora na karakteristike procesa. Upotrebom nekih od brojnih metoda eksperimentalnog dizajna možemo postići značajne uštede ljudskih i financijskih resursa, te znatno skratiti vrijeme koje je potrebno uložiti u istraživanje.²

Eksperimentalni dizajn najčešće se provodi s ciljem:

1. Određivanja faktora koji utječu na odziv ispitivanoga sustava
2. Izradbe modela utjecaja spomenutih faktora na odziv ispitivanoga sustava (uzimajući u obzir i njihove interakcije)
3. Optimizacije eksperimentalnih uvjeta, odnosno pronalaženja vrijednosti razina faktora koje osiguravaju optimalan odziv sustava
4. Minimiziranja broja pokusa radi postizanja pozitivnoga ekonomskog učinka²

Ostvarivanje navedenih ciljeva postiže se izvođenjem niza pokusa, osmišljenih tako da se vrijednosti jednoga ili više relevantnih faktora mijenjaju prema unaprijed definiranim obrascima.

Općenito se mogu razlikovati dva pristupa planiranju: slijedno planiranje i istodobno planiranje. Slijedno planiranje koristi se u optimizaciji, pri čemu je eksperimentalna domena podijeljena u niz fragmenata od kojih se jedan odabire kao početni. U njemu se pristupa izradbi manjega broja pokusa čiji odzivi postaju osnova za planiranje u sljedećem fragmentu. Istodobno planiranje, za razliku od slijednoga planiranja, prikladno je pri modeliranju, ali može služiti i u optimizacijske svrhe. Karakteristika toga planiranja jest definiranje eksperimentalnog dizajna prije početka mjerenja, pokusi se, u pravilu, ne izvode naknadno.³

Osnovna vrsta istodobnoga planiranja je *potpuno faktorsko planiranje* na dvije razine. Njime su definirane dvije razine svakog promatranog faktora, a pokusi se izvode uzimajući u obzir sve permutacije razina pojedinih faktora (za k faktora potrebno je 2^k pokusa). U slučaju da se mora ispitati veći broj faktora, uporaba potpunoga faktorskog planiranja zahtijevala bi provedbu neopravdano velikoga broja pokusa. U takvim je situacijama prikladnije koristiti se *djelomičnim faktorskim planiranjem* koje znatno smanjuje broj pokusa, primjerice 2^{k-1} .

Eksperimentalni dizajn ima prednost mogućnosti oblikovanja kompleksnog sustava i istraživanje utjecaja na uzorke kao i istraživanje njihovih drugih svojstava. U takvim statistički planiranim eksperimentima variranje takozvanih faktora omogućava izostavljanje slučajnih utjecaja određenih svojstava, odnosno, slučajnih pogrešaka koje se mogu pojaviti tokom analize. Istovremeno, poredak izvođenja eksperimenata bi trebao biti slučajan kako bi se izbjegle sistematske pogreške. Uz statistički planirane eksperimente poznajemo i takozvane sekvencijalne eksperimente kod kojih poredak izvođenja pokusa ovisi o rezultatima dobivenim u prošlom eksperimentu. U principu se preporučuje eksperimente planirati statistički.³

Prirodni procesi najčešće se mogu aproksimirati modelima prvoga ili drugoga reda, ali se ne smije zanemariti primjena modela viših redova, premda se njima vrlo rijetko služimo.

Kada govorimo o tumačenju odnosno interpretaciji rezultata eksperimenta moramo uzeti u obzir da će očitani rezultati uvijek sadržavati određenu grešku tj. da će rezultat biti „oštećen“ zbog uvijek prisutnih neidealnosti prilikom mjerenja i uzorkovanja. Stoga kada govorimo o istraživanju i analizama u okolišu, gdje je sustav vrlo kompleksan, puno faktora može utjecati na svojstva uzorka koji se analizira. Upravo kod ovakvih analiza eksperimentalni dizajn se pokazao kao izuzetno koristan alat jer kvalitetnim planiranjem samog uzorkovanja i daljnjih metoda obrade uzorka te mjerenja možemo osigurati znatno pouzdaniju analizu samog uzorka.⁴

2.2. Temeljna načela

Temeljna načela eksperimentalnog dizajna neizostavan su dio svakog eksperimenta. Tri su temeljna načela eksperimentalnog dizajna:

- 1) replikacija
- 2) randomizacija
- 3) blokiranje⁵

Pod pojmom replikacija smatramo ponavljanje osnovnog eksperimenta određeni broj puta. Replikacija mjerenja s određenom kombinacijom faktora je nužna za procjenu eksperimentalne pogreške. Nadalje, uz pomoć srednje vrijednosti uzorka za procjenu utjecaja faktora u eksperimentu, replikacija omogućava ispitivaču dobivanje preciznije procjene tog utjecaja.

Randomizacija se odnosi na izvođenje eksperimenata slučajnim redoslijedom. Slučajan redoslijed izvođenja eksperimenata obavezan je u slučaju da se sistematske greške ne mogu izbjeći ili da ih je potrebno detektirati.

Blokiranje je postupak koji koristimo kako bi povećali preciznost mjerenja. Blok predstavlja dio uzorka koji bi trebao biti homogeniji od čitavog uzorkovanog materijala. Postupak blokiranja podrazumijeva izradu usporedbi između značajnih utjecaja u eksperimentu i svakog bloka.⁵

2.2.1. Ceteris – paribus princip

Ponekad efekt nekog od faktora možemo samo pretpostaviti i stoga ga treba ispitati prikladnim eksperimentima. Zbog kompleksnosti većine analitičkih problema u analizi okoliša prilikom izvođenja eksperimenta biti će prisutni dodatni faktori koji su ili nepoznati ili na njih naprosto ne možemo utjecati. Faktori na koje ne možemo utjecati mogu biti npr. prisutnost nečistoća u reagensima, nestabilnost izvora plazme, promjena kvalitete rada asistenta u laboratoriju. Pošto je pomno proučavanje svih potencijalnih faktora u praksi gotovo nemoguće što veći broj faktora treba održavati konstantnima. Ovaj osnovni princip poznat je pod nazivom ceteris – paribus princip.⁵

2.3. Dizajn faktora

S obzirom na broj uključenih nezavisnih varijabli n , x_1 , ..., x_n razlikujemo jednofaktorski ($n=1$) i višefaktorski dizajn ($n>1$). S obzirom na broj dobivenih odziva m , y_1 , ..., y_m rezultate možemo prikazati u obliku matrice pri čemu redovi matrice označavaju broj provedenih eksperimenata, a u stupce se unose izmjereni odzivi tj. rezultati mjerenja (Tablica 1.).⁶

Tablica 1. Prikaz rezultata eksperimenta. ⁶

Broj uzorka	Vrsta uzorka	Godišnje doba uzorkovanja	Izmjereni odzivi			
			Pb	Zn	TOC	El. vodljivost
	x_1	x_2	y_1	y_2	y_3	y_4
1	Pitka voda	Ljeto	y_{11}	y_{12}	y_{13}	y_{14}
2	Pitka voda	Zima	y_{21}	y_{22}	y_{23}	y_{24}
3	Otpadna voda	Ljeto	y_{31}	y_{32}	y_{33}	y_{34}
4	Otpadna voda	Zima	y_{41}	y_{42}	y_{43}	y_{44}

$$Y = \begin{bmatrix} y_{11} & y_{12} & y_{13} & y_{14} \\ y_{21} & y_{22} & y_{23} & y_{24} \\ y_{31} & y_{32} & y_{33} & y_{34} \\ y_{41} & y_{42} & y_{43} & y_{44} \end{bmatrix} \quad (1)$$

Jednadžba 1 prikazuje matrični zapis rezultata. Ponavljanjem mjerenja za isti uzorak dobivamo rezultate istog razreda koje nazivamo ćelijom. Tako s obzirom na navedeni primjer (tablica 1.) gdje je mjerenje ponovljeno četiri puta dobivamo rezultate za „razred II“ kao vrijednosti $y_{11,1}$, $y_{11,2}$, $y_{11,3}$ i $y_{11,4}$. Za procjenu rezultata tada najčešće koristimo analizu varijancije ili skraćeno ANOVA. Primjer analize varijancije dan je u poglavlju 2.4. ⁶

Postoji više načina pomoću kojih možemo doći do optimalnih rezultata:

- 1) statistički, pomoću faktorskog dizajna
- 2) pomoću rezultata sekvencijalnih eksperimenata baziranih na algoritmima (npr. simpleks metoda)
- 3) stohastičkim metodama (mreže, *screening*...) ⁷

Ovim metodama možemo, na primjer, pratiti i nadzirati stanje okoliša odnosno interakciju sastavnica okoliša sa prisutnim onečišćenjima. Međutim od izuzetne je važnosti imati kvalitetan plan uzorkovanja kojim bi obuhvatili sve moguće izvore utjecaja na rezultate analize tj. uzorak treba biti reprezentativan. ⁷

2.3.1. Podjela faktorskih dizajna

U faktorskom dizajnu imamo n promjenjivih faktora koji se mogu svrstati u razine. Faktore koji utječu na rezultate mjerenja mogu biti kvantitativni i kvalitativni. Kvantitativni su na primjer temperatura, pH, intenzitet miješanja itd., dok su kvalitativni na primjer starost membrana kod ionski selektivnih elektroda ili u uređajima za pročišćavanje.

Ako svaki faktor sadrži isti broj razina govorimo o tzv. *simetričnom dizajnu*, a ako je pak broj ponovljenih mjerenja s obzirom na kombinaciju svake od razina konstantan govorimo o *balansiranom* ili *uravnoteženom dizajnu*.⁷

Najčešće je dovoljno započeti dizajn u kojem su u obzir uzete samo najviše i najniže razine svakog faktora. U ovom slučaju imamo dizajn sa dvije razine i n faktora što rezultira dizajnom tipa $k=2^n$ gdje je k broj potrebnih mjerenja koje treba izvršiti. Pomoću rezultata tih mjerenja možemo procijeniti koeficijente a_n pripadajućih polinomnih modela za svaku varijablu reakcije y : $y=f(x_1, \dots, x_n)$.⁸

Matematički gledano, ovaj model prikazuje površinu odziva varijable y . Iz matematike znamo da se regresivnom analizom mogu procijeniti nepoznati koeficijenti iz pripadajućih jednakosti, te je u nastavku prikazano kako se direktno mogu izračunati koeficijenti određenih regresijskih modela na bazi eksperimentalnog dizajna prema primjeru iz tablice 1. Pretpostavimo da su eksperimenti iz primjera ($k=4$) izvedeni unutar dizajna koji je već spomenut (2^n).⁶

Možemo izračunati maksimum svih četiriju koeficijenata prema jednadžbi 2:

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 \quad (2)$$

S obzirom na varijable, koeficijenti su proporcionalni takozvanim glavnim i interakcijskim efektima ili efektima međudjelovanja ukoliko im je pridruženo više od jedne varijable. Identifikacija takvih efekata od izuzetne je važnosti u istraživanjima okoliša, a posebice kod procjene utjecaja onečišćenja na sastavnice okoliša. Statistička ispitivanja značajnosti tih koeficijenata moguća su u slučaju da imamo procijenjenu varijanciju od prije ili ako možemo ponoviti neka mjerenja ili čak cijeli dizajn.⁶

Alternativno rješenje bi bilo da varijanciju dobijemo ponovnim mjerenjima tzv. *centralne* ili *središnje točke* dizajna koja označava točku između svih razina faktora. Statističari su definirali nekoliko optimalnih karakteristika dizajna s obzirom na procijenjena svojstva, ali za potrebe ovoga rada dovoljno je spomenuti *optimalni dizajn* s obzirom na broj izvedenih mjerenja.

Jedan od načina smanjivanja tj. optimizacije broja izvedenih mjerenja jest upotreba *dijelomičnog dizajna faktora*. Takva vrsta dizajna moguća je ukoliko se međudjelovanja faktora mogu zanemariti. U ovome ćemo slučaju jednadžbu 2 prevesti u oblik prikazan jednadžbom 3:

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_3 \quad (3)$$

Koeficijent a_{12} predstavlja svojevrsnu procjenu efekta novog faktora x_3 i mogući efekt međudjelovanja x_1x_2 na odziv mjerenja y .

Faktorski dizajni koji ovise o načinu kombiniranja faktora mogu se podijeliti u dvije glavne skupine. Ako je moguće kombinirati svaku pojedinu razinu svakog od faktora sa pojedinom razinom svih ostalih faktora, tada govorimo o *križnom dizajnu*. Drugu skupinu nazivamo *hijerarhijskim dizajnima*. U takvim dizajnima razine jednog faktora se ne mogu kombinirati sa razinama svih ostalih faktora.

Kao teoretski primjer možemo uzeti istraživanje koje je izvršeno u dva različita laboratorija (faktor 1) koji ne mogu razmijeniti zaposlenike (faktor 2). U laboratoriju 1, inženjeri A i B vrše analizu dok u laboratoriju 2 analizu vrše inženjeri C i D.⁶

U slučaju da laboratoriji mogu izmjenjivati zaposlenike tada bi npr. inženjer C mogao zamijeniti mjesto sa inženjerom B i tako provesti analizu, te bi to teoretski mogli klasificirati kao *križni dizajn*.⁶

2.3.2. Faktorski dizajni viših redova

Daljnja redukcija broja mjerenja je moguća biranjem posebnih oblika dizajna koje su razvili, npr. Hartley, Westlake, Box i Behnken, te ostali. Kod ovih oblika dizajna odnos broja mjerenja prema broju potrebnih koeficijenata smanjen je gotovo na omjer 1:1. Kod ovakvih oblika dizajna situacija je ponešto drugačija od regresivne analize, gdje je u principu, k eksperimenata ili mjerenja dovoljno za procjenu k parametara modela.⁹

U dizajnu eksperimenta optimalni broj mjerenja je izveden statistički kako bi se obuhvatilo što više mogućih varijacija faktora. Također možemo upotrijebiti i modele višeg stupnja koji mogu biti nezaobilazni ako je odziv nelinearan. Pomoću njih možemo izračunati utjecaj dodatnih koeficijenata na odziv uz razumnu količinu dodatnog rada i vremena kao npr. za dizajn oblika 3^n koji ima n faktora u tri razine.⁹

2.3.3. Određivanje razina faktora

Korak određivanja razina faktora često predstavlja najvažniju točku faktorskog dizajna. U analizi okoliša, nije uvijek očito koje faktore treba smatrati važnima. Uključivanje previše faktora u prvom koraku može u jednu ruku rezultirati znatno povećanim brojem izvedenih mjerenja ili uzetih uzoraka, čak i kad je u pitanju najjednostavniji dizajn 2^n .

Uzmimo na primjer slučaj ispuštanja određenih količina neke onečišćujuće tvari u okoliš iz industrijskog postrojenja na nekom području. Da bi proveli ovakvo ispitivanje potrebno je uzeti uzorke sa različitih lokacija i dubina. U ovome bi nam slučaju najviše odgovarao upravo dizajn 2^2 jer su nam bitna dva faktora, a to su lokacija i dubina. Za početak je stoga potrebno odrediti udaljenost i dubinu s koje ćemo uzimati uzorke. Sljedeći korak je izvođenje eksperimenata, odnosno mjerenja koncentracija kadmija u uzorcima s obzirom na razine faktora i njihove moguće kombinacije.⁸

2.3.4. Poopćivanje dizajna

Većinom se u praksi koristimo jednom, općom, shemom za slične situacije. Generalna shema za 2^2 dizajn, ali i brojne druge, bazirana je na proceduri transformacija koja koristi tzv. *poludomet* (eng. half-range), *hr* i *središnju vrijednost* (eng. central value), *cv* svakog faktora.

$$hr = \frac{x_{\max} - x_{\min}}{2} \quad (4)$$

$$cv = \frac{x_{\max} + x_{\min}}{2} \quad (5)$$

Zatim, sve razine x_i , svakog od faktora, mogu biti transformirane u oblik:

$$z_i = \frac{x_i - cv}{hr} \quad (6)$$

Pri čemu Z_i predstavlja standardiziranu varijablu tj. faktor.

Za prikaz rezultata vrlo često koristimo kodirane vrijednosti -1 i +1. Kodirana vrijednost -1 predstavlja nižu razinu faktora, a kodirana vrijednost +1 višu razinu faktora. Uz pomoć kodiranih vrijednosti svaki sličan eksperiment u budućnosti možemo dizajnirati prema istoj shemi bez obzira na stvarne vrijednosti n faktora, x .⁶

2.4. Analiza varijancije (ANOVA)

Analiza varijancije ispituje prisutnost sustavne razlike između skupina podataka različitih razina jednoga ili više faktora.

Faktori mogu biti: temperatura i pH-vrijednost, vrijeme uzorkovanja, prisutnost onečišćenja itd. Ukupna varijancija podataka izražava se kao suma kvadrata odstupanja podataka od ukupne srednje vrijednosti, te se dijeli na varijanciju uzrokovanu odstupanjem unutar skupina podataka i varijanciju uzrokovanu odstupanjem između skupina. Navedeni izvori varijancije uspoređuju se F-testom, tj. omjerom varijancija dvaju nizova podataka.¹⁰

S obzirom na izračunanu F-vrijednost zaključuje se ima li ispitivani parametar značajan utjecaj na ispitivane podatke. Ukoliko je potrebno ispitati utjecaj dvaju ili više faktora, tada se može koristiti dvofaktorskom ili višefaktorskom analizom varijancije koja se zasniva na sličnim pretpostavkama.¹⁰

2.4.1. Primjer analize varijancije pomoću F-testa

Pripravljene su četiri standardne otopine klorida masenoga udjela $w = 21,00 \%$. Tri različite titracijske metode upotrijebljene su za analizu svake od četiriju otopina. Redoslijed izvođenja mjerenja bio je slučajan. Podatci mjerenja prikazani su u tablici 2.¹¹

Treba ispitati postoji li značajna razlika između masenih udjela klorida u četirima otopinama i onih dobivenih trima različitim titracijskim metodama.¹¹

Tablica 2. Podatci mjerenja.¹¹

Uzorak	w (metoda 1) / %	w (metoda 2) / %	w (metoda 3) / %
Otopina 1	21,03	21,13	21,09
Otopina 2	21,05	21,13	21,15
Otopina 3	21,02	20,94	21,12
Otopina 4	21,12	20,97	21,10

Izračun analize varijancije na temelju navedenih podataka prikazan je tablicom 3.

Tablica 3. Prikaz rezultata analize varijancije.¹¹

Izvor varijancije	Zbroj kvadrata odstupanja	Stupnjevi slobode	Aritmetičke sredine kvadrata odstupanja, S ²	F - vrijednost
Između metoda	$\sum_{j=1}^k n_j (\overline{x_j} - \overline{x})^2 = 0,012$	k – 1 = 2	$\frac{1}{k-1} \sum_{j=1}^k n_j (\overline{x_j} - \overline{x})^2 = 0,006$	$\frac{S^2_{IM}}{S^2_{UM}} = 1,365$
Unutar metoda	$\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \overline{x_j})^2 = 0,041$	n – k = 9	$\frac{1}{n-k} \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \overline{x_j})^2 = 0,004$	
Ukupno	$\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \overline{x})^2 = 0,053$	n – 1 = 11		

Kritična F -vrijednost uz pouzdanost 0,053 za navedeni broj stupnjeva slobode iznosi 4,256. Budući da je izračunata F -vrijednost manja od kritične, možemo zaključiti da ne postoji značajna razlika u mjerenjima između pojedinih otopina i pojedinih metoda.¹¹

2.5. Uzorkovanje

Svrha analize okoliša je utvrđivanje postojećeg stanja okoliša ili praćenje radi dobivanja spoznaje o njegovoj kvaliteti, stupnju onečišćenja, određivanja područja s izrazito visokim koncentracijama onečišćivala (tzv. „vruće točke“) te procjene rizika za okoliš ili neke njegove sastavnice.

Budući da se analizira samo vrlo mali dio ukupnoga materijala, izbor toga dijela iz cjeline najkritičniji je korak analitičkoga sustava. Loše uzorkovanje unosi najveću pogrešku u analitički proces jer je pogreška uzorkovanja višestruko veća od mjerne pogreške, pa i ukupna pogreška ponajprije ovisi o načinu i planu uzorkovanja.

Ispitivanjima je nađeno da se 67% ukupnoga standardnog odstupanja analitičkog procesa odnosi na uzorkovanje, 20% na pripravu uzorka i samo 13% na mjerenje. Još su znakovitiji rezultati dobiveni obradom podataka o udjelu kalija u biljnom materijalu, koja pokazuje da se čak 84% ukupne pogreške odnosi na uzorkovanje, 3,8% na nehomogenost laboratorijskog uzorka, 9,4% na međulaboratorijske pogreške, 1,4% potječe od pripreme uzorka, a samo 1,4% ukupne pogreške uzrokovano je mjernom nepreciznošću.¹²

2.5.1. Postupak uzorkovanja

Okoliš je definiran trima prostornim dimenzijama. Prva dimenzija definira udaljenost od izvora onečišćenja, npr. nizvodna udaljenost od mjesta ispuštanja otpadne vode iz nekog postrojenja. Dvije dimenzije definiraju plohu, odnosno područje kao što je poljoprivredno dobro, močvara, površina jezera i mora, šuma i slično. Primjer dvodimenzionalnog problema je uzorkovanje onečišćivala u površinskom sloju tla na određenoj udaljenosti od izvora onečišćenja. Pritom se ne uzima u obzir dubina tla, pa je mjesto uzorkovanja određeno samo geografskom dužinom i širinom. Treća dimenzija definira visinu ili dubinu pa obuhvaća atmosferu, slojeve tla ili dubinu mora, rijeka jezera itd.

Uzorkovanje u tri dimenzije je uobičajeno kada se udio onečišćivala mijenja s dubinom vode, odlagališta otpada ili poljoprivredne površine. Drugi je primjer uzorkovanje zraka, kad je u određivanju mjesta i nadmorske visine uzorkovanja nužno predznanje o mogućim inverzijama temperature, vjetru i turbulencijama.¹⁰

Budući da se okoliš mijenja s vremenom, potrebno je uzorke uzimati u različitim vremenskim intervalima što je četvrta dimenzija. Ako se svojstva analiziranoga dijela okoliša mijenjaju s vremenom tome se prilagođuju i ciljevi uzorkovanja, npr. koncentracija onečišćivala na izlazu iz nekog industrijskog postrojenja u vremenu uzorkovanja ili prosječna godišnja koncentracija onečišćujuće tvari.

Kako nas u većini slučajeva zanimaju promjene stanja okoliša u određenome prostoru i vremenu, ispravni zaključci o stanju dijela okoliša koji se uzorkuje mogu se dobiti samo ako se uzimaju u obzir sve četiri navedene dimenzije.¹⁰

Ispravno uzorkovanje jedna je od najtežih zadataka u analitičkome procesu pa je nužno definirati svrhu i cilj uzorkovanja i željenu kemijsku informaciju. Tome se podređuje *plan uzorkovanja*, ovisno zanima li nas prosječni sastav uzorka ili njegova promjena u prostoru i vremenu.

Prilikom izrade plana nužna je prethodna informacija o prirodi i svojstvima materijala koji se uzorkuje. Ako je uzorak homogen, bilo koji dio ispitivanoga materijala dat će reprezentativan uzorak. Budući da većina uzoraka iz okoliša nije homogena, nužno je prikupiti niz uzoraka kako bi se osigurala reprezentativnost. Postupak uzorkovanja određen je i agregatnim stanjem i maticom uzorka (anorganski, organski, biološki uzorci) te koncentracijom analita. U planiranju treba definirati postupak uzorkovanja i uzeti u obzir hoće li se analiza izvoditi na mjestu uzorkovanja (*in situ*) ili u laboratoriju.¹³

2.5.2. Osiguravanje reprezentativnosti uzorka

Da bi se osigurala reprezentativnost uzorka potrebno je:

- 1) identificirati populaciju koja se uzorkuje,
- 2) osigurati odgovarajući broj uzoraka,
- 3) odrediti učestalost i vrijeme uzorkovanja,
- 4) definirati plan uzorkovanja,
- 5) pravilno provesti postupak poduzorkovanja.¹²

Treba također odrediti mjesto uzorkovanja, veličinu uzorka te način uzorkovanja kojim će se postići da ispitni uzorak sadržava sve informacije sadržane u uzorkovanom materijalu. Važno je razmotriti i dostupnost uzorka te njegovu stabilnost i na temelju tih spoznaja organizirati njegov transport i skladištenje do trenutka i mjesta analize.¹²

Iz populacije se određenim postupcima poduzorkovanja izdvajaju jedinični uzorci. Oni se mogu analizirati zasebno ili se spajaju u zbirni uzorak. Ako je jedinični uzorak ili zbirni uzorak prevelik za analizu, on se postupcima poduzorkovanja smanjuje do laboratorijskoga uzorka. Dio uzorka koji se analizira naziva se ispitnim uzorkom koji mora biti homogen i stabilan te mora sadržavati sva svojstva ispitivane populacije. Dakle, tijekom postupka poduzorkovanja ne smije se izgubiti niti narušiti reprezentativnost uzorka. Ako je laboratorijski uzorak prikladan za izravnu analizu tada je on ujedno i ispitni uzorak.

Prilikom uzorkovanja okoliša preporučuje se uzimati relativno veliku masu uzorka, što nije problem jer u većini slučajeva analize okoliša dostupno dovoljno materijala.¹²

2.5.3. Pogreške uzorkovanja

Različiti su izvori pogrešaka u analitičkome sustavu. To mogu biti nereprezentativan uzorak ili njegova pogrešna identifikacija, loš izbor ili provedba metode, pogrešno ili neredovito kalibriranje mjernih instrumenata te neispravna procjena rezultata i prosljeđivanja informacija. Neki od tih izvora mogu se brzo otkriti i ispraviti, a za druge treba dulje vrijeme i dodatna obuka laboratorijskog osoblja, koje ne bi smjelo samo slijediti pisane upute, nego bi trebalo razumjeti sustav i prepoznavati moguće izvore pogrešaka.

Pogreška uzorkovanja može biti sustavna, slučajna i gruba. Sustavna pogreška uzorkovanja definirana je kao razlika između sastava ciljane populacije i prosječne vrijednosti sastava velikoga broja uzoraka uzetih iz te populacije. Ona je uzrokovana heterogenošću materijala koji se uzorkuje i nemogućnošću uzimanja uzorka koji će odražavati tu heterogenost. Heterogenost uzorka može biti posljedica različite veličine čestica, oblika, sastava čestica u čvrstim materijalima te različitih molekula u tekućim uzorcima ili pak uzrokovana razdvajanjem te grupiranjem čestica različita sastava ili različitih molekula. Ostali mogući izvori sustavne pogreške uzorkovanja su: nepridržavanje ili loše provođenje protokola uzorkovanja, neprepoznavanje granica ciljane populacije, onečišćenje uzorka, gubitci uzorka te njegova interakcija sa stjenkama posude.

Premda je sustavnu pogrešku teško kvantificirati, ponekad ju je moguće izbjeći pravilnim izborom metode uzorkovanja, povećanjem veličine uzorka, čime se postiže bolja reprezentativnost, usitnjavanjem čvrstoga materijala i uzimanjem poduzoraka te miješanjem odnosno homogenizacijom čime se smanjuje utjecaj raslojavanja materijala.¹⁴

Sustavna pogreška uzorkovanja procjenjuje se usporedbom s referentnom populacijom koja mora biti dovoljno velika kako bi se osiguralo da velik broj uzastopnih uzorkovanja neće utjecati na sastav materijala. Pritom je glavni problem cijena održavanja dugoročne stabilnosti vrlo velike mase uzorkovanog materijala. U praksi je teško procijeniti sustavnu pogrešku uzorkovanja, međutim i tada je bolje procijeniti barem slučajnu pogrešku, nego u potpunosti ignorirati nesigurnost uslijed uzorkovanja.

Slučajnu pogrešku je lakše kvantificirati i minimizirati. Ona je uglavnom uzrokovana promjenama sastava uzorka, s obzirom na mjesto i vrijeme uzorkovanja. Slučajne pogreške mogu biti i posljedica primijenjene metode uzorkovanja, u slučaju da se koriste različite metode, postupka uzorkovanja ili rukovanja uzorkom, ako je u uzorkovanje uključeno više osoba, te same opreme za uzorkovanje.

Slučajna pogreška može se smanjiti uzimanjem većega broja uzoraka, što utječe na smanjenje standardnog odstupanja. Moguće je uzeti i veći broj poduzoraka koji čine zbirni uzorak.

Gruba pogreška posljedica je nerazumijevanja ili pogrešnog pristupa analizi, pa će i rezultati u koje su one uključene biti sumnjivi i neće se moći statistički obraditi. Sumnjive vrijednosti posljedica su mjerenja koja ne pripadaju uzorkovanoj populaciji. Ako se pojavljuju često, mogu biti znak lošeg programa osiguravanja kvalitete, na što se može utjecati. Grube pogreške treba nastojati ukloniti odmah čim se otkriju i poduzeti dugoročne mjere za njihovo izbjegavanje.¹⁴

2.5.4. Dizajn plana uzorkovanja

Dobar vodič pri izboru najboljega plana uzorkovanja jest prethodna spoznaja o materijalu koji se uzorkuje, željenoj informaciji i zahtijevanoj razini preciznosti. Nije svejedno želimo li u uzorku odrediti tragove nekoga analita ili makrosastojak.

Plan uzorkovanja uključuje detaljne opise populacije koja se uzorkuje, analita koji se određuje, objašnjenje potrebnoga broja uzoraka, mjesta i vremena uzorkovanja te postupke smanjivanja uzorka do laboratorijskoga, odnosno ispitnoga uzorka.

Za uzorke tla, uzorci mogu biti određeni geografskom dužinom i širinom, ili u odnosu prema nekome objektu. Uzorci vode i atmosfere određeni su geografskom dužinom i širinom, ali i trajanjem uzorkovanja. U planu uzorkovanja treba odrediti vremenski raspon unutar kojega se uzorkovanje mora provesti.¹⁵

Dobar plan uzorkovanja osigurava da će dobiveni rezultati biti odgovarajući i predstavljati populaciju iz koje su uzeti. Prilikom uzorkovanja neophodno je uzeti u obzir učinkovito planirano vrijeme, financijska sredstva i osoblje.¹⁵

Da bi se definirao broj uzoraka te mjesto i vrijeme uzorkovanja moraju se prilikom izrade plana uzorkovanja uzeti u obzir sljedeći čimbenici:

- 1) Ciljevi – utvrđivanje postojećeg stanja, praćenje stanja okoliša, procjena rizika
- 2) Varijabilnost – promjene u prostoru i promjene s vremenom
- 3) Cijena – cijena uzorkovanja, analize i fiksni troškovi u odnosu na promjenjive troškove
- 4) Ostali čimbenici – prikladnost uzorkovanja, dostupnost mjesta uzorkovanja, dostupnost uređaja i osoblja, zakonske odredbe¹⁵

Planovi uzorkovanja mogu se temeljiti na statističkim ili intuitivnom uzorkovanju. U statističkim se planovima uzorkovanja primjenjuje teorija uzorkovanja i slučajni izbor pojedinačnih uzoraka. Statističko uzorkovanje omogućuje da svaki član populacije iz koje je uzorak uzet ima jednaku i poznatu vjerojatnost da bude uzorkovan. Prilikom primjene statističkoga uzorkovanja, mogu se na temelju podataka analize pojedinačnih uzoraka statističkom obradom izvesti zaključci o uzorkovanoj populaciji. Intuitivni plan uzorkovanja temelji se na znanju i iskustvu stručnjaka koji provodi uzorkovanje. Statističko planiranje uzorkovanja najbolje je primijeniti kada ne postoje prethodne spoznaje o populaciji koju treba uzorkovati. Na malim područjima intuitivno uzorkovanje može poslužiti kao preliminarno, nakon čega slijedi sustavno uzorkovanje.

Različite strategije i pristupi uzorkovanju mogu se koristiti zasebno ili zajedno, ovisno o potrebama i cijeni. U svakom slučaju uzorkovanje mora započeti s planiranjem koje se temelji na specifičnosti određenoga problema.¹⁴

2.5.5. Uzorkovanje vode

Uzorkovanje vode iz okoliša treba planirati i provesti u skladu sa spoznajama o razlogu uzorkovanja, značajkama uzorkovane vode, svojstvima i koncentraciji onečišćujućih tvari te analitičkome laboratoriju koji će ih određivati.¹⁵

Ispitivane se vode s obzirom na svoje značajke mogu razvrstati na: površinske (rijeke, jezera, more, izvori), podzemne, oborinske, vode za piće, industrijske i kanalizacijske ispuste te vode onečišćene kemikalijama.

S obzirom na način uzorkovanja razlikujemo vode koje teku u otvorenim (rijeke ili kanali industrijskih otpadnih voda) ili zatvorenim sustavima (cijevi), vode koje miruju u zatvorenim spremnicima (tankovi), te vode u otvorenim stajaćicama (mora, jezera).

Često je neophodna suradnja analitičara s hidrogeolozima, hidrometeorolozima, biolozima, toksikolozima i stručnjacima za statistiku. Strategija uzorkovanja površinskih voda ovisi o hidrogeološkim uvjetima (npr. vrsta tla na obali), udaljenost mjesta uzorkovanja od ispusta vode u okoliš, dnevnim i godišnjim promjenama protoka vode, njezinoj temperaturi, sastavu biosfere, predviđenoj koncentraciji onečišćujuće tvari, brzini protoka vode na mjestu uzorkovanja i drugim čimbenicima. Kada se želi ispitati uzrok onečišćenosti rijeke, uzorkuju se obalne vode, područja slaboga protoka, matica rijeke, sediment i biološki materijal, a pri uzorkovanju priobalnih morskih voda dodatnu pozornost treba obratiti na utjecaj plime i oseke i morskih struja.

Onečišćujuće tvari u vodi sudjeluju u brojnim fizikalnim i kemijskim procesima (taloženje, difuzija, adsorpcija na sediment, solvatacija, biotransformacija i bioakumulacija itd.), a podložna su utjecajima izvana (temperatura, pH i sl.).

Prilikom uzorkovanja nastoji se uzeti što veći obujam vode, posebice kada je riječ o određivanju koncentracije onečišćujuće tvari koje su niže od granice određivanja metode, ili kad se predviđa velik broj određivanja iz istog uzorka. Čistoća posuđa u koje se uzorkuje vrlo je bitna za rezultate analize, osobito pri određivanju tragova sastojaka. Ponekad mogu poslužiti dobro oprane staklene ili plastične boce, ali treba izbjegavati pranje detergentima. Treba imati na umu i da plastika može adsorbirati različite organske tvari, a staklo nije prikladno za uzorkovanje anorganskih materijala.

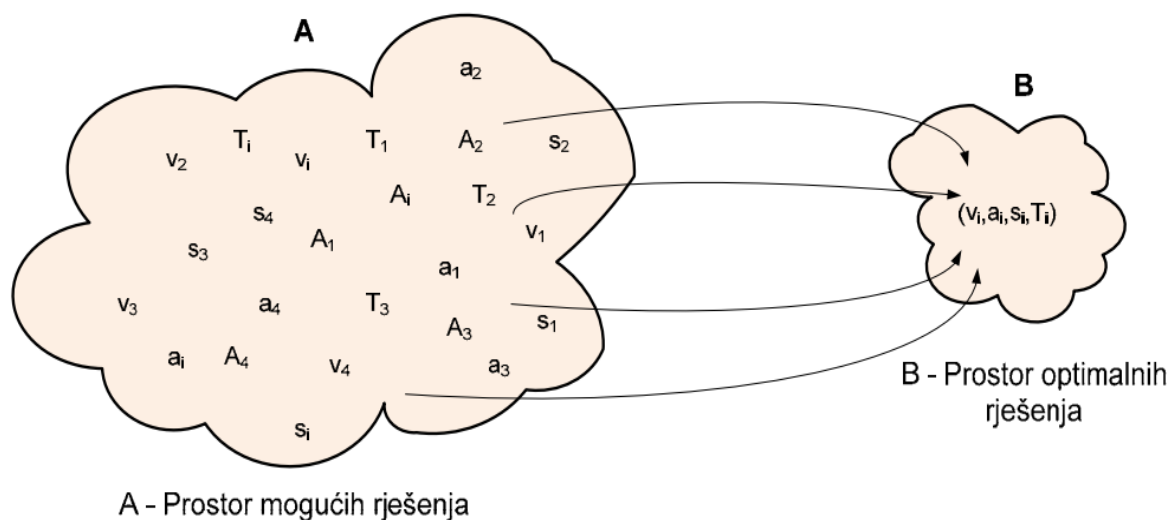
Kako bi se osigurala homogenost tekućine, neposredno prije mjesta uzorkovanja treba izazvati turbulentno strujanje, što se postiže sužavanjem ili svijanjem cijevi. Pri brzom protoku takva intervencija nije potrebna. Svaka tekućina što duže stoji u zatvorenom spremniku podložnija je raslojavanju zbog različite gustoće sastojaka.¹⁵

Kako ju je zbog velikog obujma nemoguće homogenizirati, uzorak se uzima s različitih dubina te se pripravlja zbirni uzorak. Zbirni se uzorak ne može upotrijebiti za analizu sastojaka koji se znatno mijenjaju stajanjem, te su za takve uzorke nužne analize *in situ*.¹⁵

Posebnu pozornost treba obratiti načinu konzerviranja uzoraka do trenutka analize, pri čemu treba imati na umu da način konzerviranja ovisi o analitu. Ako se uzorci znatno mijenjaju stajanjem, konzerviranje je nužno.¹⁵

2.6. Optimizacija

Optimizacija je postupak definiranja najpovoljnijih rješenja za dane početne uvjete, iz skupa mogućih rješenja (Slika 1.).



Slika 1. Definiranje optimalnih rješenja iz skupa mogućih rješenja.¹⁶

Potpuniju definiciju optimizacije određuju tri osnovna pojma koji su s njom u nerazdvojnoj vezi, a to su:

- 1) cilj optimizacije
- 2) objekt optimizacije
- 3) metoda optimizacije¹⁶

Cilj optimizacije se iskazuje preko funkcije cilja ili kriterija optimizacije, a metodom optimizacije se ostvaruje postavljeni cilj optimizacije na objektu optimizacije.

Objekt optimizacije može biti neki proces u širem ili užem smislu te sustav (tehnološki, obradni, proizvodno-pogonski itd.).¹⁶

Nema ograničenja kada je u pitanju izbor objekta optimizacije, jer postoji potreba da se svako tehničko ili tehnološko rješenje unaprijedi, što se dakako postiže primjenom metode optimizacije. Može se reći da gotovo ne postoji područje čovjekove djelatnosti, sustav ili proces koji se na neki način ne bi mogao optimizirati.¹⁶

Kada govorimo o inženjerskim procesima metodologiju optimizacije možemo podijeliti na makro i mikro optimizaciju.

Makro optimizacija obradnog procesa i sustava najviše se odnosi na izbor optimalne varijante tehnološkog procesa (izbor optimalne tehnološke metode, odnosno postupka obrade, redoslijeda operacija i zahvata itd.).

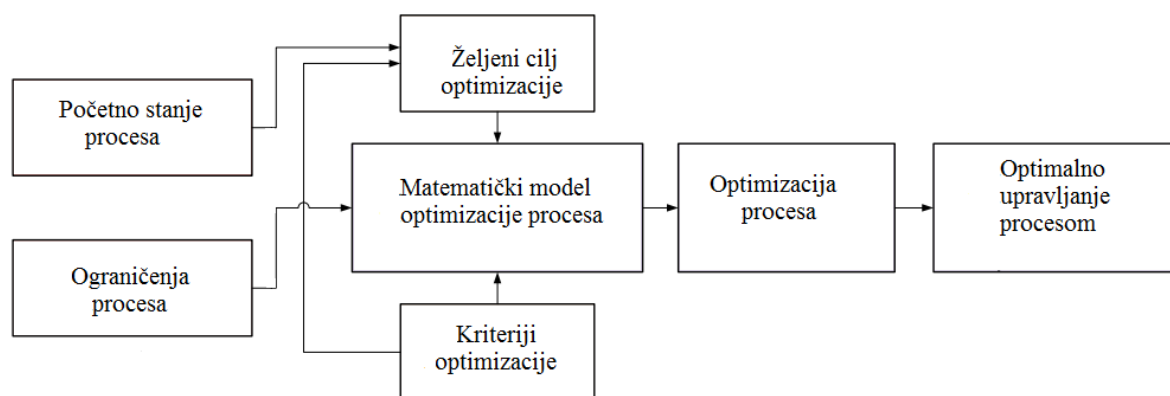
Mikro optimizacija obradnog procesa ili sustava odnosi se na optimizaciju elemenata režima obrade, geometrije i postojanosti alata, vremena obrade, sredstava za podmazivanje i drugo.

Kod optimizacije procesa često se kreće od matematičkog modela procesa kojim ga opisujemo. Postavi se odgovarajući kriterij za optimizaciju procesa te se traži kombinacija elemenata procesa iz područja mogućih rješenja, kako bi odgovarajuća funkcija cilja dobila ekstremnu vrijednost (minimum ili maksimum). Jedan od kriterija može biti maksimalni profit, maksimalna produktivnost ili minimalni troškovi, minimalno vrijeme obrade, maksimalna postojanost alata obrade itd.

U teoriji optimizacije procesa moguća su, u pogledu spoznaje funkcije cilja kao jednog od osnovnih polaznih elemenata matematičkog modeliranja optimizacije (Slika 2.) i upravljanja ovim procesima, tri slučaja:

- 1) matematički model funkcije cilja ili funkcija optimizacije nije poznata,
- 2) poznat je, ili se može analitičkim putem izvesti, oblik i struktura funkcije cilja, ali su nepoznati parametri (efekti) modela funkcije,
- 3) poznati su i oblik i parametri modela funkcije cilja danog procesa

Prvim i drugim slučajem bavi se teorija adaptivne (eksperimentalno-statističke) optimizacije, dok je treći slučaj predmet analitičkih (determinističkih) metoda optimizacije procesa.¹⁷



Slika 2. Struktura matematičkog modela optimizacije procesa.¹⁶

U praksi se često, kao kriteriji optimizacije, odnosno željeni ciljevi prema kojima se optimiziraju procesi uzimaju: troškovi, vrijeme trajanja procesa, ekonomičnost odnosno isplativost procesa, stupanj iskorištenja procesa itd.¹⁶

Osim optimizacije u samom laboratoriju zbog, na primjer, dobivanja najboljeg odziva tijekom razvijanja neke metode ili što boljeg rezultata određenog mjerenja, na rezultate analize okoliša izuzetno velik utjecaj ima korak uzorkovanja koji je ujedno i najkritičniji dio analitičkog postupka. Postoji nekoliko metoda optimizacije, a najjednostavnija od njih je tzv. *simpleks metoda*.¹⁷

2.6.1. Simpleks metoda

Gledajući općenito, simpleks metodu koristimo za rješavanje problema linearnog programiranja. Linearno programiranje je problem u kojem tražimo maksimum ili minimum linearne funkcije u skupu rješenja sustava linearnih jednadžbi ili nejednadžbi. Optimalno rješenje predstavlja ono rješenje u kojem funkcija dostiže minimum ili maksimum. Skup mogućih rješenja je konveksan poliedar koji ima konačan broj vrhova i bridova. U slučaju da postoji optimalno rješenje, ono se nalazi u barem jednom vrhu.

Ideja simpleks metode je generiranje kandidata, odnosno vrhova kojima dolazimo do optimalnog rješenja problema. Prva faza je generiranje jednog vrha, a druga faza tzv. *hod* kojim se pomičemo iz trenutnog vrha u susjedni, „bolji“ vrh. Pri tome „bolji“ vrh predstavlja onaj koji se nalazi bliže optimalnog rješenja.¹⁸

U slučaju da rješavamo problem maksimuma, bolji vrh ima veću vrijednost, a ako rješavamo problem minimuma, bolji vrh ima manju vrijednost. Postupak se zaustavlja u optimalnom vrhu ili u vrhu iz kojega je vidljivo da optimalno rješenje ne postoji.¹⁸

2.6.2. Nelder – Mead metoda rješavanja simpleksa

Nelder – Mead metoda je tehnika za rješavanje problema minimuma u višedimenzijском prostoru. Metoda se temelji na traženju uzorka kojim uspoređujemo vrijednosti funkcije u svim točkama simpleksa. Najgora dobivena točka se odbacuje, te se uvodi nova točka koja sa ostalima čini novi simpleks.

Nalaženje točke u svakoj iteraciji može rezultirati širenjem ili smanjivanjem raspona simpleksa. Smanjivanje simpleksa dovodi do pomaka svih točki prema optimalnom rješenju.

Simpleks koji se koristi kod Nelder – Mead metode optimizacije funkcije dviju varijabli je trokut. Za svaki korak iteracije izračunava se novi simpleks, odnosno trokut na način da se mijenja najgora točka trokuta iz prethodnog koraka.

Postoje dva načina rješavanja simpleksa prema Nelder – Mead metodi. Prvi je način rješavanje simpleksa s konstantnim „*hodom*“, a drugi s promjenjivim *hodom*.¹⁸

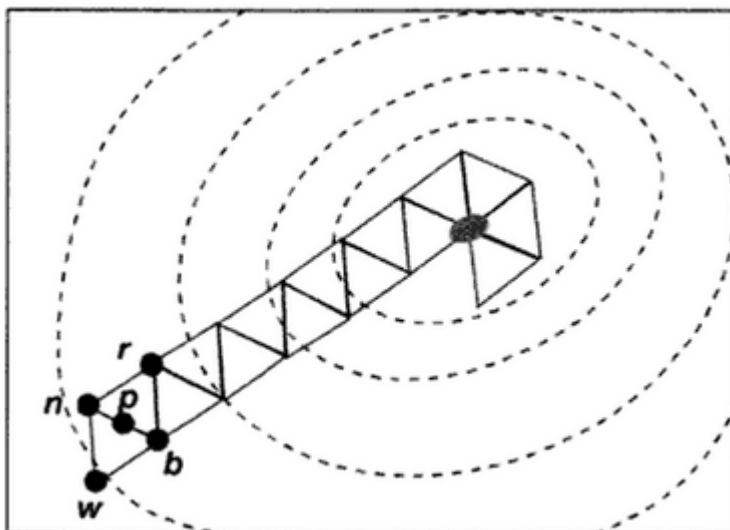
Kod prvog načina (slika 3.) simpleks rješavamo sljedećim koracima:

- 1) odrede se početne točke simpleksa
- 2) izračunaju se funkcije cilja za sve točke simpleksa
- 3) iz dobivenih rezultata zaključimo koja je točka najgora (točka w), zatim koja je točka najbolja (točka b), te točku koja predstavlja drugo najbolje rješenje (točka n)
- 4) izračuna se težište svih točaka osim najgore prema jednažbi 7:

$$p = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (7)$$

- 5) pomoću točke p izračuna se točka refleksije (točka r):

$$r = p + (p - w) \quad (8)$$



Slika 3. Karakteristične točke simpleksa s konstantnim hodom.¹²

Navedeni koraci ponavljaju se sve dok se simpleks ne počne rotirati oko optimalnog rješenja. Specifičnost ovakvog načina rješavanja simpleksa je u konstantnim dužinama „hoda“. Upravo ta karakteristika ujedno predstavlja i problem jer ako se na početku izabere prevelik korak postoji mogućnost da promašimo optimum, a ako pak uzmemo premalen korak, to može rezultirati neopravdano velikim brojem pokušaja traženja optimalnog rješenja.

Drugi način rješavanja simpleksa prema Nelder – Mead metodi razlikuje se od prvoga po tome što dužina „hoda“ nije konstantna. S obzirom na način računanja prva četiri koraka su identična, međutim tada slijede koraci:

5) računamo točku refleksije pomoću točke težišta:

$$r = p + \alpha(p - w) \quad (9)$$

6) ako je točka refleksije, r , bolja od točke b , simpleks proširujemo jednakžbom:

$$e = p + \gamma(p - w) \quad (10)$$

7) ako je r lošije od n vršimo tzv. *kontrakciju simpleksa*. Ako je r lošije od n , ali bolje od w , kontrakcija se odvija u pozitivnom smjeru prema jednakžbi:

$$c^+ = p + \rho(p - w) \quad (11)$$

U slučaju da je r lošije od n i w kontrakcija se odvija u negativnom smjeru:

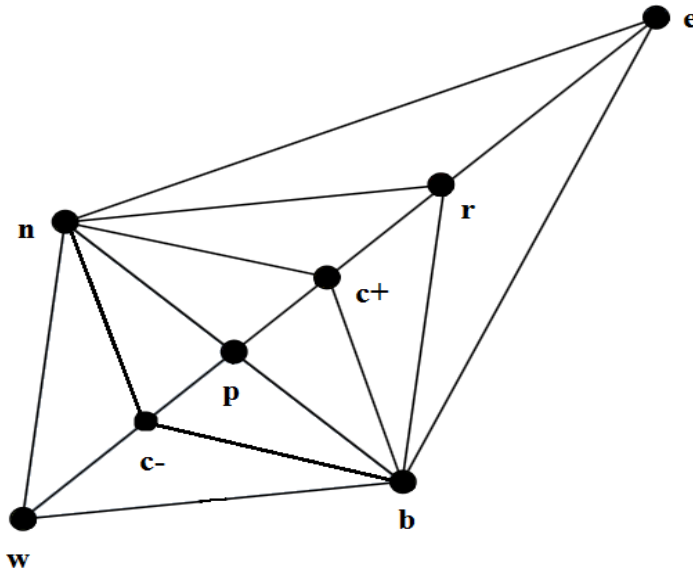
$$c^- = p - \rho(p - w) \quad (12)$$

8) korak redukcije u kojemu za sve točke osim najbolje računamo nove točke:

$$x_i = b + \sigma(x_i - b) \text{ za } i = 2, \dots, n+1 \quad (13)$$

Nakon koraka redukcije proces počinje ispočetka i ponavlja se dok se ne postigne optimalno rješenje.

α , γ , ρ i σ su koeficijenti refleksije, ekspanzije, kontrakcije i redukcije. Njihove standardne vrijednosti iznose: $\alpha = 1$, $\gamma = 2$, $\rho = \frac{1}{2}$, $\sigma = \frac{1}{2}$.



Slika 4. Karakteristične točke simpleksa s promjenjivim hodom. ¹⁸

U praksi, simpleks metoda je najčešće upotrebljavana metoda optimizacije eksperimenata pomoću algoritama. Glavne prednosti su joj jednostavnost, brzina i pouzdanost kod jednostavnijih slučajeva. Međutim pokazala se relativno nepouzdanom kod složenijih slučajeva u kojima postoji više optimalnih rješenja. Kod takvih slučajeva moramo upotrijebiti druge optimizacijske metode, npr. metodu konjugiranih gradijenata ili Powellovu metoda. ¹⁸

3. Pregledni dio

3.1. Empirijsko modeliranje interferencijskih utjecaja na određivanje kalija i natrija u vodi metodom plamene fotometrije

Optimizacija analitičkog postupka koji se koristi za određenu analizu sastavnica okoliša bitan je zadatak svakog analitičara. Primjena kemometrijskih metoda u praksi se pokazala kao izuzetno koristan alat i brojne su primjene opisane u literaturi. U ovome poglavlju rada biti će prikazan primjer upotrebe eksperimentalnog dizajna i optimizacije za konkretnu studiju sa područja analize okoliša.⁶

3.2. Plamena fotometrija

Plamena fotometrija je atomska emisijska metoda za rutinsko određivanje metalnih soli, uglavnom natrija, kalija, litija, kalcija, stroncija i barija. Kvantitativno određivanje tih iona provodi se mjerenjem emisije iz plamena otopina koje sadrže metalne soli. Nemetali se ne mogu određivati ovom metodom jer ne daju izolirane neutralne atome u plamenu.

Otopine se uvode u plamen, pri čemu isparavaju, metal se atomizira, a valentni elektroni prelaze na viši energetska nivo. Povratkom u osnovno stanje valentni elektroni emitiraju elektromagnetsko zračenje karakterističnih valnih duljina za svaki metal. Iz vrijednosti intenziteta emisije zračenja moguće je kvantitativno određivanje metala u uzorku.

Plamena fotometrija jednostavna je, brza i relativno jeftina metoda koja se koristi u kliničkim i biološkim ispitivanjima, u analizi ruda i silikatnih materijala te u analizi okoliša.¹⁹

3.3. Problem

U rutinskoj analizi vode koncentracije kalija i natrija u pitkoj, površinskoj, procesnoj ili otpadnoj vodi često se analizira metodom plamene fotometrije. Za razliku od klasičnih metoda određivanje plamenom fotometrijom za alkalijske metale karakterizira visoka moć detekcije, visoka selektivnost i osjetljivost. Ova analitička metoda u praksi se pokazala izuzetno pouzdanom i brzom.⁶

Ako su prisutne visoke koncentracije ostalih alkalijskih i zemnoalkalijskih metala utjecaj njihovih emisija može se ukloniti dodavanjem otopine soli alkalijskog metala koji lakše ionizira u uzorak.

U nastavku će biti pokazano kako se moguće interferencije kod određivanja kalija i natrija u vodi metodom plamene fotometrije mogu opisati i ukloniti pomoću empirijskog modeliranja.⁶

3.4. Korišteni dizajn i modeli

Utjecaj komponenti uzorka vode na određivanje kalija i natrija plamenom fotometrijom može biti određen pomoću višefaktorskog dizajna. Primjenom višefaktorskog dizajna moguće je kvalitativno odrediti utjecaj više varijabli sa relativno malim brojem eksperimenata.

Upotrijebljeni višefaktorski dizajn prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Korišteni višefaktorski dizajn.⁶

Eksperiment	Varijabla i izražena pomoću transformirane koncentracije x_i								Odziv
k	x_0	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	y_k
1	1	1	1	1	-1	1	-1	-1	y_1
2	1	1	1	-1	1	-1	-1	1	y_2
3	1	1	-1	1	-1	-1	1	1	y_3
4	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	y_4
5	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	y_5
6	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	y_6
7	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	y_7
8	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	y_8

Model kojim možemo prikazati utjecaj interferencija možemo formulirati na način da vezu između odziva y i koncentracija i analiziranih komponenti postavimo pomoću polinomnog modela:

$$y = a_0 + \sum_{i=0}^n a_i x_i + \sum_{\substack{i,j=1 \\ (i \leq j)}}^n a_{ij} x_i x_j + \dots \quad (14)$$

pri čemu x_i i x_j predstavljaju linearno transformirane koncentracije c_i .⁶

U ovome slučaju koncentracije su linearno transformirane pomoću jednadžbi 15 i 16:

$$x_i = \frac{c_i - \overline{c_i}}{\overline{c_i}} \quad (15)$$

$$\overline{c_i} = \frac{c_i^h - c_i^l}{2} \quad (16)$$

c_i^h i c_i^l predstavljaju visoku i nisku razinu koncentracije s obzirom na višefaktorski dizajn (tablica 4.). Ovako postavljen model pogodan je za linearan opis odnosa koncentracija i dobivenih odziva.⁶

3.5. Izvedba eksperimenta

Mjerenja su izvršena pomoću plamenog fotometra FLAPHO 4 (Carl Zeiss Jena) koristeći mješavinu propan-zrak za dobivanje plamena. Istražen je utjecaj sulfatnih, kloridnih i fosfatnih iona, te iona ostalih alkalijskih metala na određivanje kalijevih i natrijevih iona u uzorku. Anioni su izabrani na temelju prošlih eksperimenata kako bi se odredila njihova interferencijska svojstva.

Višefaktorski dizajn ostvaren je sa razinama koncentracija komponenti iz tablice 5.

Tablica 5. Razine koncentracija u korištenom višefaktorskom dizajnu.⁶

x_i	Komponenta	$c_i^h (x_i^h = 1)$, $\mu\text{g/mL}$	$c_i^l (x_i^l = -1)$, $\mu\text{g/mL}$
1	Natrij	15	0
2	Kalij	5	0
3	Pseudovarijabla	-	-
4	Sulfati	400	0
5	Pseudovarijabla	-	-
6	Kloridi	350	0
7	Fosfati	7	0

Raspon koncentracija kalija i natrija odgovara njihovim koncentracijama u pitkoj vodi na istraživanom području u periodu od nekoliko godina. Koncentracije sulfata, klorida i fosfata su unutar propisanih granica s obzirom na propisane vrijednosti za pitku vodu. Dvije pseudovarijable uzete su kako bi se mogla procijeniti eksperimentalna pogreška.

Za svaki je uzorak mjerenje ponovljeno pet puta, te su izvršena slučajnim redoslijedom kako bi se minimalizirala mogućnost sistematske greške.⁶

4. Rezultati i rasprava

Izmjereni odzivi i pripadajuće standardne devijacije uzoraka dobivenih plamenom fotometrijom dani su u tablici 6.

Tablica 6. Izmjereni odzivi i standardne devijacije.⁶

Uzorak	y_K ($\mu\text{g/mL}$)	y_{Na} ($\mu\text{g/mL}$)	S_K	S_{Na}
1	5,07	15,66	0,06	0,17
2	5,19	14,42	0,06	0,15
3	0,08	13,94	0,00	0,06
4	4,83	0,16	0,00	0,00
5	0,12	14,35	0,00	0,12
6	0,06	0,15	0,00	0,00
7	4,90	0,41	0,06	0,00
8	0,04	0,05	0,00	0,00

4.1. Izračun i testiranje regresijskih koeficijenata

Na temelju višefaktorskog dizajna (tablica 4.) možemo oblikovati model:

$$y = a_0 + \sum_{i=0}^7 a_i x_i \quad (17)$$

Koeficijente od a_0 do a_7 dobivamo kao umnožak x_i i y_i , podijeljen sa brojem uzoraka tj. otopina pa se stoga, na primjer, koeficijent a_4 izračunava prema jednadžbi 18:

$$a_4 = \frac{-1 \cdot y_1 + 1 \cdot y_2 - 1 \cdot y_3 - 1 \cdot y_4 + 1 \cdot y_5 + 1 \cdot y_6 + 1 \cdot y_7 - 1 \cdot y_8}{8} \quad (18)$$

Varijable x_3 i x_5 predstavljaju pseudovarijable. Komponentu x_3 možemo pisati kao umnožak komponenti x_1 , x_6 i x_7 , ili x_2 , x_4 i x_6 . Prateći analogiju, komponentu x_5 možemo pisati kao umnožak komponenti x_1 , x_4 i x_6 ili x_2 , x_6 i x_7 .²

Sada se može postaviti model:

$$y = a_0 + a_1 x_{Na^+} + a_2 x_{K^+} + a_3 x_{Na^+} x_{Cl^-} x_{PO_4^{3-}} + a_4 x_{SO_4^{2-}} + a_5 x_{Na^+} x_{SO_4^{2-}} x_{Cl^-} + a_6 x_{Cl^-} + a_7 x_{PO_4^{3-}} \quad (19)$$

i

$$y = a_0 + a_1 x_{Na^+} + a_2 x_{K^+} + a_3 x_{K^+} x_{SO_4^{2-}} x_{Cl^-} + a_4 x_{SO_4^{2-}} + a_5 x_{K^+} x_{Cl^-} x_{PO_4^{3-}} + a_6 x_{Cl^-} + a_7 x_{PO_4^{3-}} \quad (20)$$

a_3 i a_5 su koeficijenti kojima opisujemo interakcije ispitivanih komponenti u vodi, a ostalim koeficijentima opisujemo direktan utjecaj iona na odziv.⁶

4.2. Ispitivanje regresijskih koeficijenata

Prvi je korak računanje prosječne pogreške mjerenja s_y prema jednadžbi:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^M s_k^2}{M}} \quad (21)$$

Iz izračunate vrijednosti s_y pomoću jednadžbe 22 dobivamo pogrešku regresijskih koeficijenata, s_a :

$$s_a = \frac{s_y}{\sqrt{M \cdot m}} \quad (22)$$

m predstavlja broj ponovljenih mjerenja za pojedini uzorak tj. otopinu (m=5).

Ispitivanje regresijskih koeficijenata osniva se na *t-testu* prema Studentovoj razdiobi:

$$t_i = \frac{|a_i|}{s_a} \quad (23)$$

Izbacivanjem koeficijenata koji nisu značajni iz jednadžbi 19 i 20 model poprima oblik:

Kalij:

$$y = 2,536 + 0,079x_{Na^+} + 2,461x_{K^+} + 0,031x_{SO_4^{2-}} - 0,016x_{Na^+}x_{SO_4^{2-}}x_{Cl^-} + 0,054x_{Cl^-} \quad (24)$$

Natrij:

$$y = 7,392 + 7,200x_{Na^+} + 0,270x_{K^+} + 0,148x_{Na^+}x_{Cl^-}x_{PO_4^{3-}} - 0,060x_{SO_4^{2-}} + 0,188x_{Na^+}x_{SO_4^{2-}}x_{Cl^-} - 0,178x_{Cl^-} - 0,225x_{PO_4^{3-}} \quad (25)$$

4.3. Izračun analitičke greške uzrokovane interferencijskim utjecajima

Uvrštavanjem prosječnih vrijednosti razina koncentracija u korišteni faktorski dizajn za interferencijske komponente dobivaju se jednadžbe kojima opisujemo usklađenost tj. koherenciju dobivenih odziva s obzirom na koncentraciju analita. Koncentracije c_i su izražene u $\mu\text{g/mL}$.

Kalij:

$$y = 0,075 + 0,984c_{K^+} \quad (26)$$

Natrij:

$$y = 0,192 + 0,974c_{Na^+} \quad (27)$$

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da je utjecaj interferencija na određivanje natrija plamenom fotometrijom veći nego kod određivanja kalija. Međutim, iako je utjecaj interferencija veći, u ovome slučaju je vidljivo da su odstupanja izračunatih koncentracija natrija relativno male u usporedbi sa stvarnim vrijednostima. S obzirom na rezultate eksperimenta prikazane u tablici 7. možemo zaključiti da je upotrebom eksperimentalnog dizajna i optimizacije preciznost mjerenja znatno poboljšana. ⁶

Tablica 7. Rezultati eksperimenta. ⁶

Element	Prava koncentracija (µg/mL)	Devijacija izmjerenih koncentracija od stvarnih	Devijacija modeliranih koncentracija od stvarnih
Kalij	0	0,075	0,076
	5	0,132	0,002
Natrij	0	0,192	0,201
	15	0,738	0,424

5. Zaključak

Upotrebom metoda eksperimentalnog dizajna i optimizacije možemo znatno povećati preciznost samih mjerenja tokom izvođenja eksperimenta. Možemo smanjiti i vrijeme potrebno da se eksperiment provede kao i količinu resursa koje je potrebno uložiti u provođenje eksperimenta. Eksperimentalni dizajn ima prednost mogućnosti oblikovanja kompleksnog sustava i istraživanje utjecaja na uzorke kao i istraživanje njihovih drugih svojstava.

Uzorkovanje je ključan korak analitičkoga sustava. U slučaju da u koraku uzorkovanja nije osiguran reprezentativan uzorak unosimo daleko najveću pogrešku u eksperiment. Upravo iz toga razloga možemo reći da je ispravno uzorkovanje jedna od najtežih zadataka u analitičkome procesu. Dobar plan uzorkovanja osigurava da će dobiveni rezultati biti kvalitetni i predstavljati populaciju iz koje su uzeti.

Na primjeru iz prakse s područja analize okoliša koji je riješen u preglednom dijelu da se zaključiti da su kemometrijske metode izuzetno koristan alat u pogledu poboljšanja rezultata eksperimenata, te da je sama optimizacija analitičkih postupaka koji se koriste za analizu sastavnica okoliša bitan zadatak svakog analitičara.

6. Popis simbola

k – broj nezavisnih varijabli ili faktora

x_1, x_2, \dots, x_n – varijable procesa

y_1, y_2, \dots, y_n – odzivi procesa

a_1, a_2, \dots, a_n – koeficijenti polinomnih modela

i, j – indeks podataka

hr – poludomet faktora

cv – središnja vrijednost faktora

z_i – standardizirana varijabla ili faktor

W – maseni udio

S^2 – kvadrat odstupanja

F – vrijednost – rezultat analize varijancije koji potvrđuje ili ne postojanje razlika istraživanih uzoraka

w – najgora točka simpleksa

n – druga najgora točka simpleksa

b – najbolja točka simpleksa

p – točka težišta

r – točka refleksije

e – točka ekspanzije

c – točka kontrakcije

α – koeficijent refleksije

γ – koeficijent ekspanzije

ρ – koeficijent kontrakcije

σ – koeficijent redukcije

c – koncentracija

S – standardna devijacija

s_y – prosječna pogreška mjerenja

s_a – pogreška regresijskih koeficijenata

7. Literatura

- 1) Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jono, S., Leqy, P.J., Smeyers-Verbeke, J.; Handbook of chemometrics and qualimetrics, A i B, Amsterdam, 1997.
- 2) Anderson, V.L., Design of Experiments : a realistic approach, New York, M.Dekker, 1974.
- 3) Lawson, J., Design and analysis of experiments with SAS, Boca Raton, CRC Press, 2010.
- 4) Ruxton, G.D., Experimental design for the life sciences, Oxford, Oxford University Press, 2006. 119-127
- 5) Skoog, D.A.; Fundamentals of analytical chemistry, Southbank [etc.], Thomson, Brooks-Cole, 2004.
- 6) Einax, J.W., Zwanziger, H.W., Geiß, S., Chemometrics in Environmental Analysis, Weinheim, VCH, 1997.
- 7) Toutenburg, H., Salabh; Statistical analysis of designed experiments, New York, Springer, 2009.
- 8) Bastlevsky, A.; Statistical factor analysis and related methods : Theory and applications, Wiley, New York, 1994.
- 9) Brereton, R.G.; Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant, John Wiley & Sons, Chichester, 2003.
- 10) Roberts, M., Russo, R.; A student's guide to analysis of variance, Routhledge, London, 1999.
- 11) Kaštelan – Macan, M., Petrović, M., Analitika okoliša, HINUS & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.

- 12) Christian, G.D.; Analytical chemistry, Hoboken, J. Wiley & Sons, 2004., 712-727
- 13) Skoog, D.A.; Fundamentals of analytical chemistry, Southbank [etc.], Thomson, Brooks-Cole, 2004.
- 14) Mermet, J.M., Otto, M., Valcarcel, M.; Analytical chemistry : a modern approach to analytical science, Weinheim, Wiley-VCH, 2004.
- 15) Kaštelan-Macan, M.; Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Zagreb, Školska knjiga, 2003.
- 16) <https://www.scribd.com/document/64585141/Optimizacija> (pristup kolovoz 2016.)
- 17) Otto, M.; Chemometrics : Statistics and Computer application in Analytical Chemistry, Weinheim, Wiley – VCH, 2007.
- 18) <http://sim.riteh.hr/folders/8/Nelder-Mead%20metoda.pdf> (pristup kolovoz 2016.)
- 19) <http://www.academia.edu/7017481> (pristup kolovoz 2016.)

8. Životopis

Rođen sam 10. listopada 1992. godine u Zagrebu, gdje sam završio osnovnu školu „Žitnjak“. 2011. godine maturirao sam u Prirodoslovnoj školi Vladimira Preloga u Zagrebu na četverogodišnjem strukovnom smjeru ekološki tehničar, te sam iste godine upisao studij ekoinženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije